

## Paramecium caudatumの接合型物質の研究

著者	北村 昭夫
号	587
発行年	1978
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/24122">http://hdl.handle.net/10097/24122</a>

氏名・（本籍）	きた　むら　あき　お 北　村　昭　夫
学位の種類	理　学　博　士
学位記番号	理博第　５８７　号
学位授与年月日	昭和５３年　３月２４日
学位授与の要件	学位規則第５条第１項該当
研　究　科　専　攻	東北大学大学院理学研究科 （博士課程）　生物学専攻
学位論文題目	Paramecium caudatumの 接合型物質の研究
論文審査委員	（主査） 教　授　樋　渡　宏　一　　教　授　小　西　和　彦 助教授　竹　内　拓　司

## 論　文　目　次

### 序　言

### 材料と方法

1. 株と培養法
2. 繊毛の分離
3. 繊毛の接合誘導比活性の測定
4. 薬　剤
5. ゲルクロマトグラフィーおよびSDS-PAGE
6. 電子顕微鏡観察

### 結　果

1. 接合過程に及ぼす糖の影響
2. 分離繊毛の性質と形態
3. 繊毛の細胞凝集活性に及ぼす薬剤の影響

4. 接合型物質抽出の試み

5. L I S膜小胞の性質

6. 膜小胞の再構成

## 論 議

1. 接合型物質の化学的性質とその存在様式

2. 再構成膜小胞とL I S膜小胞

## 要 約

## 謝 辞

## 引用文献

## 図表とその説明

## 論 文 内 容 要 旨

ゾウリムシの接合過程は、性的な細胞凝集反応により開始され、この反応がゾウリムシの繊毛を介しての接着であることから、繊毛に接合型物質が存在すると考えられている。ところが、接合型物質の化学的性質はまだ充分には明らかにされておらず、抽出も分子のかたちでは成功していない。本研究は (1)ゾウリムシの接合型物質の化学的性質と繊毛膜における存在様式の検討 (2)接合誘導活性をもつ現在得ることが可能な最小の系である繊毛膜小胞の単離法の確立及び (3)膜小胞の解離一再構成の手法による接合型物質精製の試みについて検討をおこなった。

(1) ゾウリムシの分離繊毛を材料に繊毛の有する特異的な細胞凝集活性に対する薬剤の影響を定量的に測定した結果、次の成績を得た。

A 繊毛の細胞凝集活性(以下単に活性と略す)は高濃度塩溶液やキレート剤処理では全く影響を受けないが、エタノール、ブタノールなどの有機溶媒や種々の界面活性剤に対しては著しく活性を低下した。

B 5種類の糖分解酵素( $\alpha$ -mannosidase,  $\alpha$ -L-fucosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase, neuraminidase)処理及び2種類のレクチン(Concanavalin A, PHA)での処理は繊毛の活性を低下させない。他方トリプシン、キモトリプシン、フィンシンなど蛋白質分解酵素の処理では繊毛は失活した。

C 過ヨース酸ナトリウム処理で繊毛は失活するが、この失活が繊毛のホルマリン前処理、あるいはアスパラギン酸ナトリウム添加により抑制されることから、過ヨース酸ナトリウムによる失活は、接合型物質の直接の失活ではなく、間接的な影響の結果である可能性が高い。繊毛成分のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動での解析により、過ヨース酸ナトリウム処理繊毛から交差結合した繊毛膜糖タンパク質が検出された。これらの結果は過ヨース酸ナトリウム処理による繊毛の失活が、接合型物質の直接の失活によるものではなく、酸化を受けた繊毛膜糖タンパク質の交差結合による接合型物質に対する立体障害が原因であることを示す。

以上の結果から、接合型物質は繊毛膜の内在性タンパク質であり、細胞凝集活性に糖残基が関与する可能性はきわめて少なく、タンパク質どうしの結合が性的凝集反応の実体であるとの結論に達した。

(2) 繊毛を2 mMあるいは4 mMジョードサリチル酸リチウム(以下LISと略す)で処理すると直径30ないし50 nmの繊毛膜小胞(LIS膜小胞)が得られる。接合型Ⅵの株の繊毛より得られるLIS膜小胞は細胞凝集活性が弱いあるいは全く無いにもかかわらず、接合型特異的に接合対を誘導する活性を強く保持している。細胞凝集なしに接合対を誘導するこの特異的な性質はLIS膜小胞ではじめて認められたものであり、この性質は単に性的な細胞認識機構だけでなく、

生体膜系における情報転換機構の解明にも重要な知見を提供するものと期待される。

- (3) 絨毛から接合型物質を直接可溶性分画に抽出する試みを行なったが、酸及びアルカリ抽出、タンパク質分解酵素処理、アルコール抽出、それに種々の界面活性剤による抽出はすべて失敗した。

他方、強い細胞凝集活性をもつ膜小胞（尿素EDTA膜小胞、Kitamura & Hiwatashi, 1976）を9mM LISで処理した可溶性分画を透析すると膜小胞が再構成され、再構成膜小胞は接合型特異的に接合対を誘導する活性をもっていた。

膜小胞の界面活性剤による解離—再構成の成功により、接合型物質精製の道が開かれるものと思われる。

## 論文審査の結果の要旨

細胞認識の分子機構は生物学の重要な課題の一つであるが、この研究はゾウリムシの有性生殖における細胞認識分子の性質を明らかにしようとしたものである。

これまでゾウリムシの性的凝集反応に関与する物質の定性的な研究はいくつか報告されているが、この研究においては先ず、性的凝集能の定量法を確立した。そしてこの定量法を用いて諸種の失活のカイネティクスをしらべ、性的凝集に与る分子の活性基には糖は関与せず、過沃素酸による失活も見かけの失活であって、交差反応の結果生ずる立体障害が原因であることを明らかにし、活性基はたんぱく質であるという結論に達した。

さらに、このたんぱく質が、どういう状態で存在するかを明らかにするために、いろいろな手段での抽出を試みたが、膜の表在たんぱく質を分離する試みは無効であって、このたんぱく質は膜の内在性たんぱくであろうという結論に達した。

次いで、この活性に関与する膜の内在性たんぱくを同定する目的で、先ず、繊毛を材料として高い凝集活性をもつ膜粒子を分離することに成功、ついでこの膜粒子の可溶化と再構成を試み、接合誘導活性をもつ膜粒子の再構成に成功した。

以上の研究はゾウリムシの性的細胞認識機構の研究を大きく飛躍させたものであり、北村が自立して研究を行う高度の学識と研究能力を有することを示している。よって理学博士の学位論文として合格と認める。